

Eine neue Glucotriose,
isoliert aus Streptococcus faecalis

INAUGURAL-DISSERTATION
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Josef Krieglstein
aus Pechgrün

1965

Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1966

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1965

Dekan: Universitätsprofessor Dr. E. Wirth

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. Dr. F. I.

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. O. Dann



Sonderdrucke aus:

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie
Band 344, S. 113-123 und S. 209-216, 1966

Eine neue Glucotriose, isoliert aus *Streptococcus faecalis*, I

Von

Werner Fischer und Josef Krieglstein *

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. November 1965)

Bei Versuchen über die Umsetzungsmöglichkeiten von 2-Desoxy-D-galaktose im Stoffwechsel fanden wir in *Streptococcus faecalis* nach Züchtung auf einem Gemisch von 2-Desoxy-D-galaktose und D-Galaktose neben noch nicht näher untersuchten 2-desoxy-glucosehaltigen Oligosacchariden eine Glucotriose. Das Trisaccharid ist in den Bakterienzellen auch nach Züchtung auf D-Galaktose in beträchtlicher Konzentration enthalten, so daß es sich um einen normalen Bestandteil dieser Bakterien handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur des Trisaccharids nach partieller Säurehydrolyse durch Identifizierung der dabei auftretenden Glucobiosen geklärt. Es handelt sich danach um 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose. Diese Verbindung wurde bisher weder chemisch synthetisiert noch in natürlichen Vorkommen gefunden. Die Synthese einer Glucotriose aus Galaktose kann als Bildung einer Reservesubstanz aufgefaßt werden. Oligosaccharide als Reservekohlenhydrate sind in höheren Pflanzen häufig, aber in dieser Funktion für Bakterien bisher nur vereinzelt beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Das Oligosaccharid wurde ursprünglich bei der präparativen Papierchromatographie gefunden, die zur Darstellung der Zuckerphosphate aus den auf einem Gemisch von 2-Desoxy-D-galaktose und D-Galaktose gezüchteten Zellen durchgeführt wurde. Es konnte aus diesen Chromatogrammen als einheitliche Fraktion eluiert werden, die anschließend durch Chromatographie an einer Kohle-Celite-Säule gereinigt wurde. Bei den Versuchen mit D-Galaktose wurde das Oligosaccharid durch direkte Chromatographie des enteweißten und entfetteten Zellinhalts an Kohle-Celite-Säulen gewonnen. Bei Züchtung auf D-Galaktose konnten daneben andere Oligosaccharide, insbesondere Disaccharide nicht nachgewiesen werden. Aus 7 g Bakterien (Feuchtgewicht) wurden 200 mg Oligosaccharid gewonnen.

Das isolierte Oligosaccharid wurde als leicht grünlich gefärbte Substanz erhalten, konnte bisher aber nicht kristallisiert werden. Es erweist sich bei Papierchromatographie in verschiedenen Fließmitteln (vgl. Abb. 1) sowie bei der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer als einheitlich und frei von anderen Zuckern.

* Teil der Dissertation von J. Krieglstein.

Bei vollständiger Säurehydrolyse läßt sich papierchromatographisch in verschiedenen Fließmitteln nur D-Glucose nachweisen, was zusätzlich dadurch gesichert wurde, daß der gesamte freigesetzte Zucker mit Glucoseoxydase umsetzbar ist.

Die Verbindung reduziert auch in hoher Konzentration (7%) Fehlingsche Lösung nicht. In Übereinstimmung damit steht die fehlende Farbreaktion mit Anilinphthalat, Triphenyltetrazoliumchlorid und 3.5-Dinitro-salicylsäure auf dem Papierchromatogramm. Der Nachweis erfolgte daher stets mit alkalischer Silbernitratlösung.

Papierchromatographisch wandert das Oligosaccharid in sämtlichen verwendeten Fließmitteln zwischen den beiden Glucotriosen Panose (6^2 -O- α -D-Glucopyranosyl-maltose) und Maltotriose, unterscheidet sich aber, wie Abb. 1 und 2 zeigen, von diesen beiden Glucotriosen durch seine Wanderungsgeschwindigkeit. Dieser Unterschied zeigt sich auch bei der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer, wonach das gefundene Oligosaccharid vor Panose liegt, die ihrerseits rascher als Maltotriose wandert.



Abb. 1. Papierchromatographisches Verhalten der aus *Streptococcus faecalis* isolierten Glucotriose (c) im Vergleich zu Panose (b), Maltotriose (d) und den in Maisirup enthaltenen Oligosacchariden (a). Absteigende Papierchromatographie in n-Pentanol/Pyridin/Wasser (7:7:6, v/v).



Abb. 2. Produkte der partiellen Säurehydrolyse von Maltotriose (a), Panose (c) und der aus *Streptococcus faecalis* isolierten Glucotriose (b). Absteigende Durchlaufchromatographie in Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser (8:2:1, v/v). Die freigesetzte Glucose hat das Chromatogramm bereits durchlaufen.

Bei der partiellen Säurehydrolyse finden sich neben Glucose nur zwei Verbindungen, die papierchromatographisch in der Zone der Glucobiosen liegen (Abb. 2 und 3). Durch die Anfärbbarkeit mit Anilinthalat und Triphenyltetrazoliumchlorid wird die schneller wandernde Komponente I als reduzierend erkannt, während die langsamer wandernde (II) den nicht reduzierenden Charakter der Ausgangssubstanz zeigt. Die erneute Säurehydrolyse der beiden aus dem Chromatogramm eluierten Verbindungen ergibt keine weitere Zwischenverbindung, so daß jene in Übereinstimmung mit ihrem papierchromatographischen Verhalten als Glucobiosen angesprochen werden können.

Eine weitgehende Identifizierung der beiden Disaccharide ist durch Papierchromatographie mit den Fließmitteln a) Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser (8:2:1, v/v) und b) n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:1:2, v/v) möglich¹, da hierbei die sämtlichen 11 isomeren Glucobiosen getrennt werden können (vgl. Tabelle). Die reduzierende

¹ L. D. Ough, Analytic. Chem. **34**, 1736 [1962].

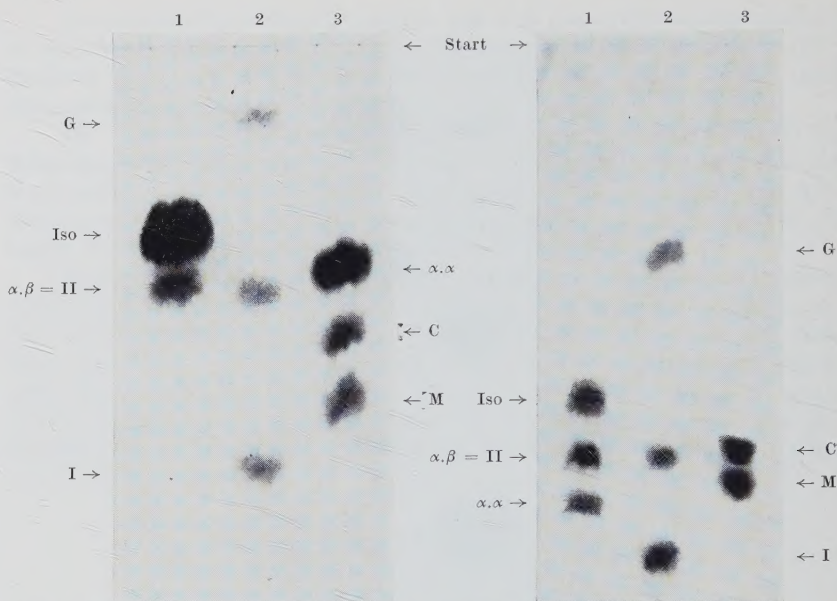


Abb. 3. Zur papierchromatographischen Identifizierung von Glucobiose I und II mit Hilfe authentischer Vergleichsdisaccharide. Absteigende Papierchromatographie (durchlaufend): links in Fließmittel a [Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser (8:2:1, v/v)], rechts in Fließmittel b [n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:1:2, v/v)]. 1 und 3 = Vergleichssubstanzen, 2 = partielles Säurehydrolysat. G = Glucotriose; I = Glucobiose I; II = Glucobiose II; M = Maltose; C = Cellobiose; Iso = Isomaltose; α,α = α,α -Trehalose; α,β = α,β -Trehalose.

R_{Maltose} -Werte für die 11 isomeren Glucobiosen und 3 Glucotriosen.

Trivial-Name	Struktur	Fließmittel a		Fließmittel b	
		Lit. ¹	gef.	Lit. ¹	gef.
Lamaribiose	3-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose	1,25	—	1,27	—
Nigerose	3-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose	1,14	—	1,27	—
Maltose	4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose	1,00	1,00	1,00	1,00
Sophorose	2-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose	0,86	—	1,10	—
Cellobiose	4-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose	0,86	0,83	0,91	0,89
Kojibiose	2-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose	0,78	—	1,04	—
α,β -Trehalose	α -D-Glucopyranosyl- β -D-glucopyranosid	0,73	0,71	0,96	0,96
α,α -Trehalose	α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid	0,69	0,64	1,07	1,09
β,β -Trehalose	β -D-Glucopyranosyl- β -D-glucopyranosid	0,65	—	0,95	—
Isomaltose	6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose	0,59	0,53	0,82	0,82
Gentiobiose	6-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose	0,59	—	0,73	—
Maltotriose	4 ² -O- α -D-Glucopyranosyl-maltose	—	0,28	—	0,48
Panose	6 ² -O- α -D-Glucopyranosyl-maltose	—	0,17	—	0,39
Glucobiose I			1,17		1,22
Glucobiose II			0,71		0,96
Glucotriose			0,18		0,47

Glucobiose I wandert in Fließmittel b wesentlich rascher als α,α -Trehalose (Abb. 3), so daß nach den R_{Maltose} -Werten in der Tabelle nur die beiden anomeren 3-O-D-Glucopyranosylglucosen in Frage kommen. Bei der weiteren Differenzierung in Fließmittel a spricht der gefundene R_{Maltose} -Wert eher für Nigerose als für die rascher wandernde Laminariobiose, wenn auch eine vollständige Übereinstimmung mit dem von Ough gefundenen Wert nicht erzielt werden konnte (Tabelle). Gesichert wurde die Bindungsart durch Behandlung des Trisaccharids mit α -Glucosidase (= Maltase, EC 3.2.1.20). Dabei verschwindet bei chromatographischer Prüfung das Trisaccharid mit etwa derselben Geschwindigkeit wie Maltose, wonach nur noch Glucobiose II nachweisbar ist. Daraus geht hervor, daß die glykosidische Bindung der Glucobiose I durch α -Glucosidase leicht spaltbar ist. Bestätigt wurde die rasche Spaltbarkeit von Glucobiose I auch durch α -Glucosidase-Einwirkung auf das partielle Säurehydrolysat. Es handelt sich somit um Nigerose.

Glucobiose II liegt, wie Abb. 3 zeigt, nach Chromatographie in Fließmittel a zwischen Cellobiose und α,α -Trehalose, so daß nur Kojibiose und α,β -Trehalose in Frage kommen (Tabelle). Die fehlende Anfärbbarkeit durch Anilinphthalat und Triphenyltetrazoliumchlorid schließt Kojibiose nicht aus, da für diese ein ähnliches Verhalten angegeben wird². Für α,β -Trehalose entscheidet jedoch die Chromatographie in Fließmittel b, da hier Glucobiose II langsamer wandert als Maltose (Abb. 3), während Kojibiose vor dieser liegen müßte. Glucobiose II besitzt nach der Tabelle in beiden Fließmitteln die gleichen R_{Maltose} -Werte wie authentische α,β -Trehalose und trennt von dieser auch bei Auftragung im gleichen Startfleck nicht ab. Sie zeigt bei Anfärbung mit alkalischer Silbernitratlösung gegenüber den reduzierenden Glucobiosen die gleiche zeitliche Verzögerung in der Farbentwicklung wie α,α - und α,β -Trehalose. Für den Trehalosebindungstyp spricht außerdem der negative Ausfall der Reduktionsproben mit dem intakten Trisaccharid. Die Identifizierung der α,β -Bindung ist nach Chromatographie in Fließmittel a eindeutig, da Glucobiose II vor α,α -Trehalose liegt (Abb. 3) und diese rascher wandert als die β,β -Form (Tabelle).

In Übereinstimmung mit der papierchromatographisch ermittelten Struktur der beiden Disaccharide steht auch ihr Verhalten bei der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer. Glucobiose I zeigt hierbei die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Isomaltose, was, nach dem papierchromatographischen Ausschluß der (1 $\rightarrow$ 6)-Bindung, die (1 $\rightarrow$ 3)-Bindung bestätigt³. Glucobiose II läuft auch hier mit α,β -Trehalose identisch und ist wiederum eindeutig gegenüber der langsamer wandernden α,α -Trehalose und damit auch gegen β,β -Trehalose⁴ abzugrenzen.

Daß bei der partiellen Säurehydrolyse neben Glucose nur zwei Glucobiosen gefunden werden, spricht bereits mit großer Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Glucotriose, worauf auch die Wanderungs-

² A. Sato u. K. Aso, Nature [London] **180**, 984 [1957].

³ A. B. Foster, J. chem. Soc. [London] **1953**, 982.

⁴ A. B. Foster u. M. Stacey, J. chem. Soc. [London] **1955**, 1778.

geschwindigkeit bei der Papierchromatographie hinweist (Abb. 1 und 2). Bei einem Tetrasaccharid, das gleichfalls zwei Disaccharide liefern würde, müßte unter den Hydrolysenprodukten mindestens ein Trisaccharid nachweisbar sein, es sei denn, daß beide Glucobiosen über eine besonders säurelabile furanosidische Bindung verknüpft wären.

Wenn auch Glucofuranosyleinheiten in natürlich vorkommenden Oligosacchariden unbekannt sind, wurde, um die letztgenannte Möglichkeit auszuschließen und die chromatographische Identifizierung der Disaccharide weiter zu sichern, das intakte Oligosaccharid mit Perjodat oxydiert und anschließend mit Chromotropsäure⁵ auf Formaldehyd geprüft. Der negative Ausfall dieser Probe zeigt, daß das Molekül keine endständigen Glykolgruppen enthält und somit zumindest die beiden außenständigen Glucosylreste in Pyranoseform vorliegen. Der Ausschluß des Furanoseringes in Glucobiose I sichert die aus ihrem papierchromatographischen und elektrophoretischen Verhalten erschlossene Identität mit Nigerose. Die daraus resultierende Bindung am C-3 der zweiten Glucoseinheit läßt im Zusammenhang mit dem negativen Ausfall der Probe auf endständige Glykolgruppen auch hier einen Furanosering ausschließen. Gleichzeitig ist dadurch im nicht reduzierenden Disaccharid für beide Glucoseinheiten die Pyranoseform gesichert und die Identifizierung als α,β -Trehalose gerechtfertigt.

Durch Ausschluß des nach den Ergebnissen der partiellen Hydrolyse noch möglichen Tetrasaccharids kann es sich nur um eine Glucotriose handeln. Negativer Ausfall der Reduktionsproben und der Nachweis einer Trehalose unter den Hydrolysenprodukten zeigen übereinstimmend, daß das Molekül kein reduzierendes Ende besitzt und demnach unverzweigt aufgebaut ist. Unter Berücksichtigung der für die beiden Glucobiosen ermittelten Konfiguration ergibt sich somit die Struktur: 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose, wobei zunächst noch offen bleibt, ob die dritte Glucoseinheit mit dem α - oder β -Anteil der Trehalose verknüpft ist. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Verbindung sind im Gang.

Das vorgenannte Trisaccharid wurde bisher nicht beschrieben. Der Bestandteil Nigerose ist als Umglykosidierungsprodukt verschiedener α -Glucosidasen bekannt und wurde auch beim Abbau bestimmter Glucane gefunden^{6, 7}. α,β -Trehalose wurde durch chemische Synthese dargestellt, ist aber in natürlichen Vorkommen unbekannt.

Sieht man von denjenigen Oligosacchariden ab, die von zahlreichen Mikroorganismen aus im Nährmedium vorhandenen Oligosacchariden durch Umglykosidierung mittels Carbohydrasen gebildet werden (vgl. l.c.⁸), so liegen über das Vorkommen von Oligosacchariden in Bakterien

⁵ J. F. O'Dea u. R. A. Gibbons, *Biochem. J.* **55**, 580 [1953].

⁶ K. Matsuda, H. Watanabe, K. Fujimoto u. K. Aso, *Nature* [London] **191**, 278 [1961].

⁷ I. J. Goldstein u. W. J. Whelan, *J. chem. Soc. [London]* **1962**, 170.

⁸ R. W. Bailey, *Oligosaccharides*, Pergamon Press, Oxford 1965.

nur vereinzelte Angaben vor. Beschrieben ist eine nicht näher charakterisierte Trehalose in Mycobakterien⁹, α -Trehalose in mehreren Propionibakterien¹⁰ sowie Gentiobiose, Laminaribiose und Sophorose in verschiedenen *Acetobacter*-Arten¹¹. Als Reservekohlenhydrat kann hiervon bisher mit Sicherheit nur die α -Trehalose der Propionibakterien betrachtet werden.

Die gleiche Funktion scheint auch der Glucotriose in *Streptococcus faecalis* zuzukommen, da sich das Trisaccharid bis zu 3% des Feuchtgewichtes in den Bakterien anreichert. Der Trehaloseanteil im Molekül sowie die relativ hohe Konzentration bei Fehlen anderer Oligosaccharide schließen eine Entstehung der Glucotriose durch fermentativen Abbau von Polysacchariden aus und lassen vermuten, daß sie ähnlich wie die pflanzlichen Oligosaccharide zu Speicherzwecken direkt als solche gebildet wird.

Für die Biosynthese kommt weder die oben erwähnte Umglykosidierung noch die Umkehr einer Hydrolasereaktion in Frage, da das Oligosaccharid bei Züchtung auf Galaktose entsteht und dabei freie Glucose in den Zellen nicht nachweisbar ist. Am wahrscheinlichsten ist ein Synthesemechanismus, der, wie für pflanzliche und tierische Oligosaccharide bekannt (vgl. l. c.¹²), seinen Ausgang von Nucleosiddiphosphatzuckern nimmt, wobei in diesem Fall UDPG oder TDPG* als Glucosyldonor in Frage kommt, die beide bei Umsetzung der Galaktose auf dem Leloir-Weg in *Streptococcus faecalis* als Zwischenprodukte nachgewiesen sind¹³. Die initiale Glucosylübertragung scheint wie bei der α -Trehalose-Bildung in Hefen und Insekten¹⁴ auf Glucose-6-phosphat zu erfolgen, da wir nach Züchtung auf Desoxygalaktose und Galaktose desoxyglucosehaltige Oligosaccharidphosphate fanden, in denen der Phosphatrest in säurestabiler Bindung vorliegt. Verlängerung des phosphorylierten Disaccharids um eine weitere Glucoseeinheit mit nachfolgender Dephosphorylierung durch eine spezifische Phosphatase könnte erklären, daß es bisher nicht gelang, neben dem Trisaccharid ein Disaccharid nachzuweisen.

* UDPG = Uridindiphosphat-glucose; TDPG = Thymidindiphosphat-glucose.

⁹ F. Winder u. P. Brennon, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **90**, 442 [1964].

¹⁰ R. Stjernholm, *Acta chem. scand.* **12**, 646 [1958].

¹¹ T. K. Walker, D. N. Pellegrino u. A. W. Khan, *Arch. Biochem. Biophysics* **83**, 161 [1959].

¹² W. Fischer u. H. Weinland, *Stoffwechsel der Galaktose und ihrer Derivate*, S. 54, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1965.

¹³ H. Pazur, K. Kleppe u. A. Cepure, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **7**, 157 [1962].

¹⁴ E. Cabib u. L. F. Leloir, *J. biol. Chemistry* **231**, 259 [1958]; J. Candy u. B. A. Kilby, *Nature* [London] **183**, 1954 [1959]; S. Friedman, *Arch. Biochem. Biophysics* **88**, 339 [1960].

Wir danken auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. B. Helferich für die Überlassung von α - β -Trehaloseoctaacetat, Herrn Professor Dr. M. Stacey für α - β -Trehalose, Herrn Professor Dr. M. L. Wolfrom für β -Maltotriosehendecacetat, Herrn Dr. L. D. Ough für Isomaltose, Herrn Dr. S. C. Pan für Panose sowie Herrn Dr. C. E. Weill für Maltotriose. Herrn Professor Dr. J. H. Pazur danken wir für die Überlassung von *Streptococcus faecalis* (Stammkultur aus dem Department of Bacteriology of Nebraska) sowie Herrn Dr. F. Legler, Direktor der Staatl. Bakt. Unters.-Anstalt, Erlangen, für die fortlaufende Züchtung der Stammkultur.

Beschreibung der Versuche

Züchtung und Aufarbeitung der Bakterien: *Streptococcus faecalis* wurde fortlaufend auf Blutagar gezüchtet. Das Bakterium wurde für den Versuch 18 Stdn. in flüssigen Subkulturen von je 50 cm³ angezüchtet, zur Gewinnung der Hauptkultur in 500 cm³ des Nährmediums übergeführt und 12–24 Stdn. bei 26° gehalten. Das flüssige Nährmedium enthielt 0,01% 2-Desoxy-D-galaktose, 0,5% D-Galaktose, 1% K₂HPO₄·3H₂O, 1% Pepton aus Casein und 0,5% Cenovis Hefeextrakt. In der zweiten Versuchsserie erfolgte die Züchtung im gleichen Medium ohne 2-Desoxy-D-galaktose. Die Bakterien wurden nach Abschluß der Wachstumsphase geerntet, vom Nährmedium abzentrifugiert (3500 × g) und zweimal mit Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Die Ausbeute betrug pro 1 Liter Nährmedium 3–4 g Bakterien (Feuchtgewicht). Die Bakterien wurden zusammen mit 10 g Glasperlen (Durchmesser 0,1 mm, Nr. 15, Dragonwerk, Bayreuth) in 15 cm³ Wasser suspendiert und im Eisbad durch Ultraschall mit Hilfe des MSE Ultrasonic Disintegrators aufgeschlossen. Da bei einer Leistung von 500 W nach 2 Min. eine Erwärmung auf 25° auftrat, wurde die Beschallung unterbrochen bis die Suspension wieder auf +3° abgekühlt war und dann über weitere 2 Min. fortgesetzt. Bereits nach der ersten Beschallung konnten mikroskopisch nur noch sehr vereinzelt intakte Zellen nachgewiesen werden.

Zur Entfernung von Eiweiß und Lipiden¹⁵ wurde das Homogenat mit 85 cm³ eines Methanol-Chloroform-Gemisches (60:25, v/v) versetzt und filtriert. Der auf dem Filter verbliebene Rückstand wurde mit 10 cm³ Methanol/Chloroform/Wasser (12:5:3, v/v) und anschließend mit 5 cm³ Chloroform gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt, unter kräftigem Umschütteln mit 25 cm³ Chloroform versetzt und nach Zugabe von 35 cm³ Wasser zur Abtrennung der organischen Phase zentrifugiert. Die so erhaltene wäßr. Phase wurde im Vakuumrotationsverdampfer (12 Torr, 30°) auf 2 cm³ eingengt.

Darstellung des Trisaccharids: In den Versuchen mit dem 2-Desoxy-D-galaktose-D-Galaktose-Gemisch wurde der eingengte Extrakt zur Gewinnung der Zuckerphosphatester auf gewaschenem Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043b) mit n-Propanol/33proz. NH₃/Wasser (6:3:1, v/v) bei 18° 24 Stdn. absteigend chromatographiert. Das mit alkalischer Silbernitratlösung anfärbbare Trisaccharid findet sich auf diesen Chromatogrammen als breite Zone über der am raschesten wandernden Phosphatester-Fraktion und ist von den schneller laufenden 2-desoxyglucosehaltigen Oligosacchariden abgetrennt. Die das Trisaccharid enthaltende Zone wurde fein zerkleinert und mit reichlich Wasser eluiert. Das eingengte gelblich gefärbte Eluat wurde über eine Kohle-Celite-Säule gereinigt (gleiche Teile Darco 60 und Celite 535). Nach Auswaschen mit Wasser und 3proz. Äthanol wurde das Trisaccharid mit 20proz. Äthanol eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer zum Sirup eingengt. Nach zweimaligem Abziehen mit absolutem Äthanol wurde das Trisaccharid als leicht grünlich gefärbte Substanz erhalten.

In den Versuchen ohne 2-Desoxy-D-galaktose wurde das Trisaccharid unmittelbar aus dem wie vorstehend enteiweißten Bakterienhomogenat durch Chromatographie an der Kohle-Celite-Säule gewonnen. Die Elution des Trisaccharids erfolgte mit 15proz. Äthanol. Die Ausbeute betrug rund 200 mg pro 7 g Bakterien (Feuchtgewicht). Disaccharide waren weder im Eluat mit 3proz. noch mit 15proz.

¹⁵ E. C. Bligh u. W. J. Dyer, Canad. J. Biochem. Physiol. **37**, 911 [1959].

Äthanol nachzuweisen. Minimale Spuren an höheren Homologen lassen sich noch nicht mit Sicherheit ausschließen, da nach Elution mit 50proz. Äthanol dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel G, Fließmittel: n-Propanol/Essigsäureäthyl-ester/Wasser 7:2:1, v/v) im Start und knapp darüber zwei mit Diaminobenzoe-säurereagens (s. u.) braun anfärbbare Zonen nachweisbar waren, die aber noch nicht weiter untersucht wurden.

Papierchromatographie: Zur Identifizierung des Trisaccharids und der bei der partiellen Säurehydrolyse entstandenen Disaccharide wurde Chromato-graphiepapier Schleicher & Schüll 2043b Mgl verwendet und stets absteigend chro-matographiert. Wir benutzten vorwiegend die von Ough¹ zur Trennung der 11 iso-meren Glucobiosen angegebenen Fließmittel a) Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser (8:2:1, v/v) und b) n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:1:2, v/v), wobei bei 220° (a) 120 Stdn. und (b) 72 Stdn. chromatographiert wurde. Die an-gegebenen R_{Maltose} -Werte wurden aus mindestens 25 Versuchen gemittelt. Sie sind bei Verwendung des Fließmittels b weniger gut reproduzierbar, wobei jedoch in allen Versuchen die Reihenfolge in der Wanderungsgeschwindigkeit für alle ge-prüften Disaccharide dieselbe blieb und mit den Ergebnissen von Ough überein-stimmte.

Zur Prüfung der Einheitlichkeit der Glucotriose wurden darüber hinaus folgende Fließmittel benutzt: c) Essigsäureäthylester/Pyridin/Eisessig/Wasser (5:5:1:3, v/v), d) n-Pentanol/Pyridin/Wasser (7:7:6, v/v) und e) n-Butanol/Py-ridin/Wasser (6:4:3, v/v).

Die papierchromatographische Identifizierung der nach totaler Säurehydroly-se freigesetzten Glucose erfolgte in Fließmittel e sowie in Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5, v/v), Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4, v/v) und Essigsäureäthyl-ester/Pyridin/Wasser (14:5:1, v/v). Nach Behandlung des Säurehydrolysats mit Glucoseoxydase (EC 1.1.3.4) war chromatographisch kein reduzierender Zucker mehr nachweisbar.

Dünnschichtchromatographie: Die Dünnschichtchromatographie auf aktivierten Kieselgel-G-Schichten [Fließmittel: n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:2:1, v/v)] und auf aktivierten Kieselgur-G-Schichten [Fließmittel: n-Butanol/ α,α' -Lutidin/Wasser (6:3:1, v/v)] wurde nur für orientierende Unter-suchungen benutzt. Nach beiden Verfahren können Glucobiosen und Glucotrisen als in sich wenig auftretende Gruppen sowohl gegeneinander als gegen höhere Homologe und freie Glucose abgegrenzt werden. Eine gewisse Trennung innerhalb der Glucobiosen und Glucotrisen ist auf den Kieselgur-G-Schichten möglich. So trennen sich hier z. B. Glucobiose I und II, und die von uns gefundene Glucotriose wandert etwas langsamer als Maltotriose. Gefärbt wurde auf den Dünnschicht-platten mit 3.5-Diamino-benzoesäure-Reagens, das ursprünglich zum Nachweis von 2-Desoxy-zuckern entwickelt wurde¹⁶. Es bewährte sich hier auch zum Nach-weis von Hexosen sowie von reduzierenden und nichtreduzierenden Oligosaccha-riden, die sämtlich beim Erhitzen der besprühten Platten auf 100° nach 20–30 Min. als braune Flecken erscheinen. Die Erfassungsgrenze liegt am gelaufenen Chromato-gramm bei 0,5 γ pro Auftragung (1 mm³).

Hochspannungselektrophorese: Verwendet wurde Chromatographie-papier Schleicher & Schüll 2043b Mgl. Die Elektrophorese wurde in 0,2M Borat-puffer, pH 10, bei 22 V/cm über 3 Stdn. durchgeführt. Die Anfärbung erfolgte mit Silbernitrat. Die auf Glucose (= 1) bezogenen Wanderungsgeschwindigkeiten betrugen ohne Berücksichtigung des elektroosmotischen Effektes: Isomaltose 0,74; Glucobiose I 0,74; α,β -Trehalose 0,35; Glucobiose II 0,35; α,α -Trehalose 0,31; Glucotriose 0,43; Panose 0,40; Maltotriose 0,37.

Säurehydrolyse: Zur vollständigen Hydrolyse wurde eine 1proz. Lösung des Trisaccharids in 1N H₂SO₄ 6 Stdn. in zugeschmolzener Ampulle im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Säure wurde vor der Papierchromatographie des Hydroly-sats mit Bariumcarbonat entfernt. Die partielle Hydrolyse der Trisaccharidlösung

¹⁶ G. Weidemann u. W. Fischer, diese Z. **336**, 189 [1964].

wurde in 0,2N H_2SO_4 in analoger Weise durchgeführt, wobei über 1 Stde. in Abständen von je 10 Min. Proben entnommen und papierchromatographisch untersucht wurden.

Spaltung mit α -Glucosidase (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio): 0,2proz. Trisaccharidlösung wurde in Phosphatpuffer (0,1M, pH 6,5) mit α -Glucosidase (0,5%) bei 37° inkubiert. Zur Beurteilung der Spaltbarkeit diente ein Vergleichsansatz mit der gleichen Menge an Maltose. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei alle 5 Min. eine Probe aufgetragen und sofort mit dem heißen Fön angetrocknet wurde. Zur papierchromatographischen Untersuchung der Spaltprodukte wurde, nachdem das Trisaccharid nicht mehr nachweisbar war, eine größere Probe mit 3proz. Perchlorsäure enteiweißt, nach Filtration über eine Austauschersäule IR 120/IR 45 entsalzt und eingeeengt. Nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung ist das Trisaccharid wie Maltose nach etwa 30 Min. verschwunden, wonach nur noch Glucobiose II vorhanden ist.

Perjodatoxydation zum Ausschluß endständiger Glykolgruppen: 1 cm³ 0,0312proz. Glucotrioselösung (mit Anthon bestimmt) wurde mit gleichen Tln. Perjodatlösung (0,015M NaJO_4 in 0,045N H_2SO_4) und 0,5M NaHCO_3 versetzt und zur Oxydation bei 20° im Dunkeln belassen. Die Reaktion wurde nach 1 und 16 Stdn. durch Zugabe von 1 cm³ 2proz. Natriumarsenitlösung unterbrochen und 1 cm³ des erhaltenen Gemisches mit 1 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt. Nach Durchmischen zeigte sich das freigesetzte Jod durch vorübergehende Gelbfärbung an. Anschließend erfolgte Zugabe von 10 cm³ Chromotropsäurereagens (1 g Chromotropsäure, Dinatriumsalz in 100 cm³ Wasser gelöst, filtriert und mit 400 cm³ 12% H_2SO_4 versetzt). Das Gemisch wurde im verschlossenen Reagensglas 30 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Extinktion bei 570 m μ im Zeiss-Spektralphotometer gemessen. Der Leerwert, der an Stelle der Zuckerlösung 1 cm³ Wasser enthielt, wurde in gleicher Weise behandelt. Als Standard diente eine durch Einwaage in ihrer Konzentration bekannte Sorbit- bzw. Glucose-

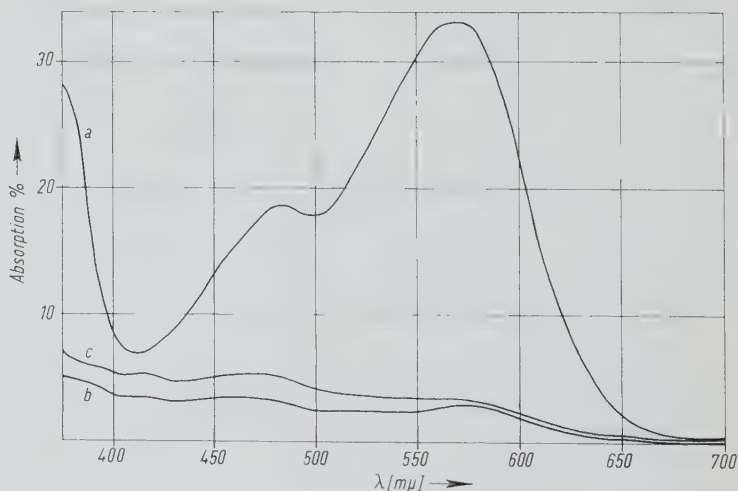


Abb. 4. Absorptionsspektrum zum Nachweis von Formaldehyd durch die Chromotropsäurereaktion nach Perjodatoxydation von a) Glucose, b) Glucotriose, c) Trehalose. Verwendet wurden äquimolare Mengen an Glucose und Glucotriose. Trehalose wurde in gleicher Konzentration wie Glucotriose eingesetzt (vgl. Text). Die Kurven wurden mit dem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman, Modell DK-2 aufgenommen.

lösung. Zum Vergleich wurde eine 0,0312proz. α -Trehaloselösung verwendet. Die Formaldehydbildung war im wesentlichen nach 1 Stde. beendet, da die nach 16stdg. Perjodatoxydation gemessenen Extinktionswerte in sämtlichen Proben keine Zunahme mehr zeigten. Während man in den Ansätzen mit Sorbit und Glucose die für Formaldehyd charakteristische Violettfärbung fand, erschienen die Proben von Glucotriose und Trehalose schwach rotbraun gefärbt. Aus der bei 570 $m\mu$ gemessenen Extinktion ergäbe sich 0,08—0,09 Mol Formaldehyd pro Mol Glucotriose. Eine ähnlich geringe Formaldehydbildung wurde in Übereinstimmung mit O'Dea und Gibbons⁵ für authent. α -Trehalose gefunden. Abb. 4 gibt ein Absorptionsspektrum für äquimolare Mengen an Glucose, Glucotriose und die in gleicher Konzentration wie Glucotriose geprüfte Trehalose wieder. Für beide Saccharide erkennt man auf dem mit fallender Wellenlänge ansteigenden Kurvenzug einen angedeuteten Gipfel in der Gegend von 570 $m\mu$, der für Spuren an Formaldehyd sprechen könnte, die nach dem Kurvenverlauf noch geringer sind, als der gemessenen Extinktion entspricht. Auf welche Weise diese Spuren an Formaldehyd aus Glucotriose und Trehalose entstehen, ist nicht geklärt. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann das Trisaccharid keine endständige Glucofuranosyleinheit enthalten, da hierbei pro Mol Glucotriose 1 Mol Formaldehyd entstünde.

Zusammenfassung

Aus *Streptococcus faecalis* wurde nach Züchtung auf D-Galaktose und 2-Desoxy-D-galaktose oder D-Galaktose allein ein Oligosaccharid isoliert, das nur aus D-Glucose aufgebaut ist und als nicht reduzierendes und damit unverzweigtes Trisaccharid charakterisiert wurde. Nach partieller Säurehydrolyse wurden neben Glucose nur zwei Glucobiosen gefunden, die auf Grund ihres Verhaltens bei Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese als Nigerose (3-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose) und α , β -Trehalose identifiziert werden konnten. Die α -Bindung im Nigeroseanteil wurde mittels Maltase gesichert, die Pyranoseform der drei Glucosyleinheiten durch fehlende Nachweisbarkeit von Formaldehyd nach Perjodatoxydation bestätigt. Nach den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich bei dieser hier erstmals beschriebenen Glucotriose um 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α , β -trehalose.

Summary

After the growth of *Streptococcus faecalis* on D-galactose and 2-deoxy-D-galactose, or on D-galactose alone, an oligosaccharide was isolated, which consisted only of D-glucose. It was non-reducing and thus characterised as an unbranched trisaccharide. After partial acid hydrolysis, glucose and only two glucobioses were found. From their behaviour in paper chromatography and high voltage electrophoresis, these were identified as nigerose (3-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucose) and α , β -trehalose. The α -linkage in the nigerose moiety was confirmed with the aid of maltase; the pyranose form of the three glucosyl units was confirmed by the absence of formaldehyde after oxidation with periodate. The oligosaccharide is thus identified as a new glucotriose, i. e., 3-O- α -D-glucopyranosyl- α , β -trehalose.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, 8520 Erlangen, Wasserturmstraße 5.

Eine neue Glucotriose, isoliert aus *Streptococcus faecalis*, II¹ *O*- α -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- β -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid

Von

Josef Krieglstein* und Werner Fischer

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 3. Dezember 1965)

In der vorausgehenden Mitteilung¹ wurde die Isolierung einer nicht reduzierenden Glucotriose aus *Streptococcus faecalis* beschrieben, die von dem Bakterium bei Züchtung auf D-Galaktose gebildet wird und offenbar als Reservekohlenhydrat dient. Nach partieller Säurehydrolyse waren nur zwei Glucobiosen nachweisbar, die auf Grund ihres Verhaltens bei Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese als Nigrose (3-*O*- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose) und α , β -Trehalose identifiziert wurden, woraus zusammen mit dem Nachweis, daß sämtliche Glucosyl-einheiten des Oligosaccharides in Pyranoseform vorliegen, auf die Struktur 3-*O*- α -D-Glucopyranosyl- α , β -trehalose geschlossen wurde. In der vorliegenden Arbeit wird das Trisaccharid weiter charakterisiert und dadurch die angegebene Struktur bestätigt.

Ergebnisse und Diskussion

Das für die nachfolgenden Untersuchungen verwendete Präparat enthielt nach Messung mit der Anthronmethode und entsprechender Berechnung aus dem Glucosewert 77,6% Trisaccharid. Nach vollständiger Spaltung mit α -Glucosidase (= Maltase, EC 3.2.1.20) und anschließender Messung der freigesetzten Glucose mit Glucoseoxydase (EC 1.1.3.4) wurde ein Trisaccharidgehalt von 79,8% berechnet. Die weitgehende Übereinstimmung der Werte zeigt in Bestätigung der papierchromatographischen Ergebnisse, daß das Trisaccharid ausschließlich aus D-Glucose aufgebaut ist. Da das Präparat nur einen Aschegehalt von 0,95% besitzt, ist die Differenz zwischen Einwaage und gemessener Konzentration auf den Wassergehalt zurückzuführen. Durch Trocknung bei 105° verlor das Präparat dementsprechend 15% an Gewicht, ohne daß Anzeichen von Zersetzung auftraten. Nach der Trocknung erwies sich die Substanz als stark hygroskopisch, so daß die quantitativen Untersuchungen auf den jeweiligen Anthron- bzw. Glucoseoxydasewert bezogen wurden.

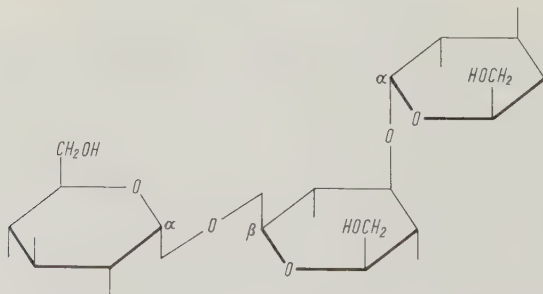
* Teil der Dissertation von J. Krieglstein.

¹ I. Mitt.: W. Fischer u. J. Krieglstein, diese Z. 344, 113 [1966].

Die fehlende Reduzierbarkeit Fehlingscher Lösung hatte in Übereinstimmung mit dem Nachweis einer Trehalose unter den Produkten der partiellen Säurehydrolyse gezeigt¹, daß sämtliche Glucoseeinheiten des Trisaccharids glykosidisch gebunden sind. Ein weiterer Beweis hierfür ist die Alkalistabilität, die sich darin äußert, daß das Trisaccharid nach 45 Min. Erhitzen in 1N NaOH im siedenden Wasserbad zu 100% wiedergefunden wird. Stabil sind unter diesen Bedingungen nur Verbindungen vom Trehalostyp, da die nur schwach reduzierenden² und relativ alkalistabilen Aldosylaldosen mit (1→2)-Bindung bereits durch Kochen in Calciumhydroxydlösung völlig zerstört werden³ und nach eigenen Untersuchungen ein Gemisch von Tri- und Tetramethylglucosen unter obigen Bedingungen einen Abbau bis zu 70% erfährt.

In Übereinstimmung mit der Alkalistabilität steht auch die fehlende Reduzierbarkeit des Trisaccharids mit Natriumborhydrid.

Bei der quantitativen Perjodatodoxydation wurden 3,92–4,05 Mol Natriumperjodat pro Mol Trisaccharid verbraucht. Da die Alkalistabilität eine Verzweigung des Trisaccharids ausschließt, ist dieser Perjodatverbrauch in Übereinstimmung mit dem Nachweis von Nigerosen unter den Hydrolysenprodukten¹ nur mit einer Struktur vereinbar, in welcher die dritte Glucoseinheit an C-3 der Trehalose gebunden ist. Da bereits die beiden Glucopyranosylenden des Moleküls je 2 Mol Perjodat reduzieren, kann der mittelständige Glucosylrest nicht oxydiert worden sein. Das ist aber nur dann möglich, wenn dieser in Pyranoseform vorliegt und die glykosidische Bindung der benachbarten Glucose an seinem dritten Kohlenstoffatom liegt, da alle anderen Möglichkeiten ein bis zwei oxydierbare Glykolgruppen ergäben.



In Übereinstimmung damit findet man nach vollständiger Perjodatodoxydation des Trisaccharids, anschließender Reduktion und Hydrolyse noch die intakte Glucose aus der Mitte des Moleküls. Als reduzierte Perjodatabbauprodukte der beiden außenständigen Glucosyleinheiten waren dünn-schichtchromatographisch nur Glykolaldehyd und Glycerin nachweisbar, wie nach der Struktur zu fordern ist.

² R. W. Bailey, S. A. Barker, E. J. Bourne, P. M. Grant u. M. Stacey, J. chem. Soc. [London] 1958, 1895.

³ R. L. Whistler u. W. M. Corbett, J. Amer. chem. Soc. 77, 3822 [1955].

Zur weiteren Sicherung der Struktur wurde das Trisaccharid permethyliert, wobei allerdings auf Grund der geringen noch zur Verfügung stehenden Menge die nach Säurehydrolyse gewonnenen methylierten Zucker vorerst nur papierchromatographisch untersucht werden konnten. Bei absteigender Chromatographie in n-Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4, v/v, organische Phase)⁴ und n-Butanol/Äthanol/33proz. Ammoniak/Wasser (40:10:1:49, v/v, organische Phase)⁵ findet man nach Anfärben mit Anilinphthalat und Anilin-Oxalsäure erwartungsgemäß nur 2 Komponenten. Die eine gehört dem R_F -Wert nach zu den Tetramethylhexosen und zeigt die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die durch vergleichsweise Methylierung von α,α -Trehalose und Cellobiose erhaltene 2.3.4.6-Tetramethyl-glucose. Die langsamer wandernde Komponente liegt im Bereich der Trimethylhexosen und wandert etwas langsamer als die aus Cellobiose erhaltene 2.3.6-Trimethyl-glucose, was nach den Angaben von Hirst, Hough und Jones⁵ für 2.4.6-Trimethyl-glucose spricht.

Die Alkalistabilität sowie die Ergebnisse der Perjodatoxydation und Permethylierung bestätigen die Struktur einer 3-*O*- α -Glucopyranosyl- α,β -trehalose, die sich aus der Identifizierung der beiden nach partieller Säurehydrolyse erhaltenen Glucobiosen ergab¹. Während für die (1 $\rightarrow$ 3)-Bindung die α -Form durch die Spaltbarkeit mittels α -Glucosidase bereits gesichert wurde¹, bestätigt die gefundene optische Drehung des Trisaccharids $[\alpha]_D = +139$ bis $+145^\circ$ die α,β -Bindung im Trehaloseanteil, da die theoretisch berechnete Drehung für ein Trisaccharid mit α,α - und β,β -Trehalose erheblich von dem gefundenen Wert abweicht:

Molare Drehwerte

Berechnete Werte:	$[M]_D$
3- <i>O</i> - α -D-Glucopyranosyl- α,α -trehalose.	$+103,4^\circ$ bis $+104,8^\circ$
3- <i>O</i> - α -D-Glucopyranosyl- α,β -trehalose.	$+ 58,9^\circ$ bis $+ 69,9^\circ$
3- <i>O</i> - α -D-Glucopyranosyl- β,β -trehalose.	$+ 21,8^\circ$ bis $+ 24,4^\circ$
Gefundene Werte:	
Glucotriose aus <i>Streptococcus faecalis</i>	$+ 69,9^\circ$ bis $+ 73,2^\circ$

Zur Klärung der Frage, an welchem Anteil der α,β -Trehalose die dritte Glucoseeinheit gebunden ist, wurde die Spaltbarkeit des Trisaccharids durch Glucosidasen näher untersucht.

Versuche mit Emulsin brachten keinen Aufschluß, da α,β -Trehalose im Gegensatz zu β,β -Trehalose⁶ wider Erwarten langsam gespalten wird. Hinzu kam, daß das verwendete Fermentpräparat nach Prüfung mit Maltose und α,α -Trehalose α -Glucosidasen enthielt, so daß sich bereits für authentische α,β -Trehalose nicht entscheiden ließ, durch welche der beiden Carbohydrasen die Spaltung erfolgt.

⁴ F. Brown, E. L. Hirst, L. Hough, J. K. N. Jones u. H. Wadman, Nature [London] **161**, 720 [1948].

⁵ E. L. Hirst, L. Hough u. J. K. N. Jones, J. chem. Soc. [London] **1949**, 928.

⁶ B. Helferich u. K. Weis, Chem. Ber. **89**, 314 [1956].

Durch α -Glucosidase wird das Trisaccharid rasch und vollständig in Glucose gespalten. Zwischenzeitlich findet sich vorwiegend α,β -Trehalose, da diese nach Versuchen mit authentischer Substanz etwas schwerer angreifbar ist als die $\alpha(1\rightarrow3)$ -Bindung des Trisaccharids, die nahezu ebenso rasch wie die $\alpha(1\rightarrow4)$ -Bindung in Maltose geöffnet wird. Daneben läßt sich jedoch, wenn auch in geringer Menge, einwandfrei Nigerose nachweisen. Da das Ferment Cellobiose unter denselben Bedingungen nicht öffnet, ist der Schluß berechtigt, daß das Trisaccharid durch α -Glucosidase von beiden Enden her angreifbar ist, womit sich der β -Glucosylanteil als mittelständig erweist. Damit kann die Struktur des Trisaccharids wie folgt formuliert werden: *O*- α -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- β -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß bei der teilweisen Spaltung des Oligosaccharides durch Maltase die gleichen Glucobiosen wie bei partieller Säurehydrolyse gefunden wurden und wie dort keine weiteren Zwischenprodukte auftraten, wodurch das Vorliegen eines Trisaccharides bestätigt wird.

Beschreibung der Versuche

Das Trisaccharid wurde wie bereits beschrieben¹ dargestellt. Der nach Reini-gung erhaltene Sirup wurde mehrmals mit absol. Äthanol abgezogen, wobei sich die Substanz in feinen, zum Teil kantigen Partikeln abscheidet. Anschließend wurde im Vak. bei 12 Torr bei 30° getrocknet. Das Präparat ist hygroskopisch und wurde daher über Calciumchlorid aufbewahrt.

Quantitative Bestimmung der Bestandteile: Durch Einwaage wurde eine 0,1proz. Lösung hergestellt und mit der Anthronmethode⁷ gegen einen Glucose-vergleichswert gemessen. Die gemessenen Glucosewerte wurden zur Berücksichti-gung der beiden glykosidischen Bindungen mit dem Faktor $504/540 = 0,933$ multipliziert und eine mittlere Trisaccharidkonzentration von 0,0776% gefunden.

Zur Messung mit Glucoseoxydase wurde das Trisaccharid (10 mg) mit α -Glucosidase-Lösung (0,1M Phosphatpuffer, pH 6,5) 5 Stdn. inkubiert, wobei nach papier-chromatographischer Kontrolle bereits nach 1,5 Stdn. keine Oligosaccharide mehr nachweisbar sind. Anschließend wurde der größte Teil des Ferments durch Hitze-koagulation und anschließende Filtration entfernt, der Niederschlag mehrmals mit Wasser nachgewaschen und auf ein bestimmtes Volumen (10 cm³) aufgefüllt. Als Reagentienleerwert wurde der gleiche Ansatz ohne Trisaccharid mitgeführt. Zur vollständigen Enteiweißung wurden beide Proben mit 10 Tln. 5proz. Trichloressig-säure behandelt und nach der der Biochemica-Testkombination (Boehringer & Soehne, Mannheim) beigegebenen Vorschrift gegen einen Glucosestandardwert gemessen. Gefunden als Glucose: 85,6% der Einwaage, was einem Trisaccharid-gehalt von 79,8% entspricht.

Zur Bestimmung des Aschegehalts wurden 8,085 mg Substanz bis zur Ge-wichtskonstanz geglüht. Gefunden: 0,077 mg, d. i. 0,952% der Einwaage.

Prüfung der Alkalistabilität: Trisaccharid wurde in 1N NaOH in zuge-schmolzener Ampulle 45 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Messung mit dem Anthroureagens wurden 100% des eingesetzten Trisaccharids wiederge-funden. Das gleiche Verhalten zeigte α,α -Trehalose, während mit Maltose unter denselben Bedingungen bereits nach 15 Min. nur 5%, und mit dem Gemisch von Trimethyl- und Tetramethyl-glucose, gewonnen aus permethylierter Cellobiose,

⁷ J. H. Roe, J. biol. Chemistry **212**, 335 [1955].

nach 1 Stde. 30% des ursprünglichen Anthronwertes gemessen wurden. Auch chromatographisch zeigte die Glucotriose nach Alkalibehandlung keine Veränderung.

Die übereinstimmenden Anthronwerte vor und nach Alkalibehandlung zeigen in Bestätigung der papierchromatographischen Ergebnisse, daß das Trisaccharidpräparat keine Verunreinigungen in Form reduzierender Oligosaccharide enthält.

Verhalten gegen Natriumborhydrid: 1 cm³ Trisaccharidlösung (0,05 bis 0,25%) wurde im Eisbad mit 0,2 cm³ 2,5proz. Natriumborhydridlösung versetzt und bei Zimmertemperatur 24–72 Stdn. belassen. Anschließend wurde zur Zerstörung des Borhydrids 0,5 cm³ 5N H₂SO₄ zugegeben und mit 8 cm³ Anthronreagens⁷ versetzt. Die hierbei auftretende Trübung wurde durch Zugabe von 5 cm³ konz. Schwefelsäure beseitigt. Sämtliche Zusätze erfolgten unter Kühlung im Wasserbad bei 16°. Anschließend wurde 10 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, im fließenden Leitungswasser gekühlt und nach 30 Min. bei Zimmertemperatur die Extinktion bei 620 m μ gemessen. Der „nicht reduzierte“ Vergleichswert wurde auf die gleiche Weise gewonnen, wobei jedoch die Zuckerlösung erst nach Zerstörung des Borhydrids zugegeben wurde. Nach 24-, 48- und 72stdg. Behandlung mit Borhydrid wurden 96, 106 und 103% des Anthronwertes der „nicht reduzierten“ Vergleichslösung gemessen. Zur Kontrolle der Methode wurde eine gleich konzentrierte Cellobioselösung verwendet und ein Verhältnis der Anthronwerte vor und nach der Reduktion von 2:1,05 gefunden.

Nach erschöpfender Behandlung mit Borhydrid und anschließender Säurehydrolyse konnte dünnschichtchromatographisch kein Sorbit nachgewiesen werden. Die Chromatographie wurde auf mit Kieselgel G beschichteten, bei 105° aktivierten Platten mit n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:2:1, v/v) durchgeführt und die Polyole mit Silbernitrat nach Stahl⁸ sichtbar gemacht. Für authent. Sorbit wurde ein R_{Glucose} -Wert = 0,45 gefunden.

Perjodatoxydation: 10 mg Trisaccharid wurden in 10 cm³ 0,015M NaJO₄ gelöst und zur Reaktion bei Zimmertemperatur im Dunkeln belassen. Zu bestimmten Zeiten wurde je 1 cm³ entnommen und mit Wasser auf 250 cm³ aufgefüllt. Der Verbrauch an Perjodat wurde durch Abnahme der Extinktion bei 222,5 m μ bestimmt⁹, wobei gegen eine dem zu erwartenden Gesamtverbrauch an Perjodat äquimolare Natriumjodatlösung gemessen wurde. Die Messung des Perjodatausgangswerts erfolgte gegen Wasser. Nach 5, 9 und 25 Stdn. waren 3,81 (3,91), 3,92 (4,03), 4,05 (4,16) Mol Perjodat pro Mol Trisaccharid verbraucht. Der Trisaccharidkonzentration ist der eingangs erwähnte Glucoseoxydase- bzw. Anthronwert (Werte in Klammern) zugrunde gelegt.

Zum Nachweis der nach Perjodatbehandlung entstandenen Oxydationsprodukte wurde im wesentlichen nach Kuhn¹⁰ verfahren. 15 mg Substanz wurden mit 0,42 cm³ Wasser, 0,84 cm³ 0,5M Acetatpuffer, pH 4,4, und anschließend unter Eiskühlung mit 1,68 cm³ 0,25M NaJO₄ versetzt und bei 4° im Eisschrank belassen. In den nach 6, 12 und 24 Stdn. entnommenen Proben (0,9 cm³) wurde das überschüssige Perjodat mit einem Mikrotropfen Glykol zerstört; die Salze wurden durch Austauschchromatographie (IR 120/45) entfernt. Nach Gefriertrocknung wurden die Rückstände jeweils mit 0,5 cm³ Wasser aufgenommen und mit 0,5 cm³ 2,5proz. Natriumborhydridlösung unter Eiskühlung durchmischt. Die Reaktion wurde 12 Stdn. bei Raumtemperatur belassen und nach Zugabe von ca. 3 mg festem Borhydrid über weitere 24 Stdn. fortgesetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Essigsäure auf pH 6,5 gebracht und die Natriumionen über eine Austauschersäule (IR 120) entfernt. Die freigesetzte Borsäure wurde durch fünfmaliges Abdestillieren mit absol. Methanol bei 20° beseitigt. Anschließend wurde bei pH 1,5 und 85° 90 Min. hydrolysiert.

⁸ E. Stahl, Dünnschicht-Chromatographie, S. 513, Springer-Verlag, Heidelberg 1962.

⁹ G. O. Aspinall u. R. J. Ferrier, Chem. and Ind. 1957, 1216.

¹⁰ R. Kuhn u. H. Wiegand, Chem. Ber. 96, 886 [1963].

Die Identifizierung der reduzierten Oxydationsprodukte erfolgte dünn-schicht-chromatographisch [Kieselgel G, aktiviert; n-Propanol/Essigsäureäthylester Wasser (7:2:1, v/v)] gegen authent. Vergleichssubstanzen. Zum Nachweis reduzierender Verbindungen wurden die Platten mit 3,5-Diamino-benzoe-säurereagens¹ besprüht und 20–30 Min. bei 100° erhitzt. Glucose erscheint in Form brauner Flecken, während Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd unter kurzzeitigem UV-Licht (285 m μ) grünlichgelb fluoreszieren. Glycerin wurde mit Silbernitrat angefärbt. Die Identität der hierbei gefundenen Glucose wurde mit Glucoseoxydase gesichert.

Permethylierung: Die Permethylierung wurde nach der für Saccharose von Kuhn angegebenen Vorschrift¹¹ mit allerdings wesentlich geringeren Mengen durchgeführt (90 mg), wobei die verwendeten Reagentien entsprechend der eingesetzten Substanzmenge auf 1/20 reduziert wurden. Als Vergleichssubstanzen wurden Cellobiose und Trehalose in der gleichen Weise behandelt. Die methylierten Produkte wurden mit Chloroform extrahiert, im Rotationsverdampfer zum Sirup eingengt, in jeweils 5 cm³ 4proz. methanol. Salzsäure aufgenommen und durch 6stdg. Kochen unter Rückfluß hydrolysiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 5 cm³ Wasser das Methanol weitgehend abgedampft und weitere 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Zur Entfernung der Salzsäure wurde mit Amberlite IR 45 neutralisiert, wobei sich gleichzeitig die schwachgelbe Lösung entfärbte. Die aus dem Trisaccharid gewonnenen, methylierten Monosen wurden zusammen mit den hydrolysierten Methylierungsprodukten von Cellobiose und Trehalose papierchromatographisch untersucht. Papier: Schleicher & Schüll 2043 b Mgl; Fließmittel: a) n-Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4, v/v, organische Phase)⁴ b) n-Butanol/Äthanol/33proz. Ammoniak/Wasser (40:10:1:49, v/v, organische Phase)⁵; Anfärbung: Anilinphthalat, Anilin-Oxalsäure.

Messung der optischen Drehung: Die optische Drehung der in Wasser gelösten Substanzen wurde im 5-cm-Rohr mit dem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter 0,005°, Zeiss, unter Vorschalten von Interferenzfiltern bei 578 und 546 m μ bestimmt und daraus die Drehung bei 589 m μ nach der dem Apparat beigegebenen Formel berechnet. In Versuch 1 wurde für 589 m μ eine Drehung von +5,49° gefunden, woraus sich $[\alpha]_D^{20} = +138,7^\circ$ für die aus dem Glucoseoxydase-wert errechnete Trisaccharidkonzentration von 7,92% und $[\alpha]_D^{20} = +143,3^\circ$ für die aus dem Anthronwert berechnete Konzentration von 7,69% ergibt. In Versuch 2 wurde $[\alpha]_D^{20}$ zu +141,3° und +145,2° ($c = 5,67$ bzw. 5,51%) bestimmt.

Für die Berechnung der molaren Drehung der Glucotriosen in der Tabelle auf Seite 211 wurden folgende $[\alpha]_D$ -Werte verwendet: 3-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose +134° bis +138°¹², D-Glucose +52,5°, α,α -Trehalose +197°, α,β -Trehalose +67° bis +95°¹³, β,β -Trehalose –38° bis –41,5°^{13,14}. Zur Berechnung des Drehungsbeitrages der (1 $\rightarrow$ 3)gebundenen α -D-Glucopyranosyleinheit wurde die molare Drehung der Glucose von derjenigen der Nigeroose subtrahiert. Zur Berechnung der molaren Drehung der Trisaccharide wurde der molare Drehungsbeitrag der α -(1 $\rightarrow$ 3)-gebundenen Glucopyranosyleinheit und die molare Drehung der jeweiligen Trehalose addiert. Es wurde, obigen $[\alpha]_D$ -Werten entsprechend, für jedes Trisaccharid der Minimal- und der Maximalwert berechnet.

Spaltung mit Fermenten: Zur Prüfung der Spaltbarkeit mit α -Glucosidase wurden 2 Tle. einer 0,1proz. Trisaccharidlösung mit 1 Tl. einer 1,5proz. Fermentlösung in 0,1M Phosphatpuffer, pH 6,5, bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde wie beschrieben¹ dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Nach 30 Min. ist das Trisaccharid verschwunden und vorwiegend α,β -Trehalose nachweisbar, die nach weiteren 30–60 Min. vollständig hydrolysiert erscheint. In gleich zusammengesetzten

¹¹ R. Kuhn, H. Trischmann u. J. Löw, Angew. Chem. **67**, 32 [1955].

¹² S. Haq u. W. J. Whelan, J. chem. Soc. [London] **1958**, 1342.

¹³ V. E. Sharp u. M. Stacey, J. chem. Soc. [London] **1951**, 285.

¹⁴ J. Staněk, Nature [London], **179**, 97 [1957].

Vergleichsansätzen war Maltose nach 30 Min., authent. und nach partieller α -Glucosidase-Spaltung des Trisaccharids papierchromatographisch isolierte α - β -Trehalose nach 90 Min. verschwunden. α - α -Trehalose wurde wesentlich langsamer gespalten und war nach 6 Stdn. zu höchstens 25% hydrolysiert. Eine Öffnung von Cellobiose konnte nicht beobachtet werden.

Zum Nachweis von Nigerose unter den enzymatischen Spaltprodukten wurde 1 cm³ einer 1proz. Trisaccharidlösung mit 0,5 cm³ einer 10proz. Fermentlösung in Phosphatpuffer 9 Min. bei 30° inkubiert, anschließend mit Perchlorsäure enteiweißt und die Perchlorsäure mit KOH entfernt. Bei Papierchromatographie mit n-Butanol/Pyridin/Wasser (6:4:3, v/v) erscheint zwischen α - β -Trehalose und Glucose eine nur schwach angefärbte, nicht sicher zu beurteilende dritte Komponente, die deshalb papierchromatographisch isoliert und angereichert wurde. Bei Papierchromatographie in Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser (8:2:1, v/v), n-Propanol/Essigsäureäthylester/Wasser (7:1:2, v/v) und n-Butanol/Pyridin/Wasser (6:4:3, v/v) gegen das partielle Säurehydrolysat des Trisaccharids erwies sich die isolierte Verbindung als mit Nigerose identisch und konnte wie diese mit Anilinphthalat und Triphenyltetrazoliumchlorid angefärbt werden.

Zur Prüfung der Spaltbarkeit durch β -Glucosidase wurde Emulsin (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA) verwendet. 2 Tle. einer 0,1proz. Trisaccharidlösung wurden mit 1 Tl. einer 1,5proz. Fermentlösung in 0,1M Acetatpuffer, pH 4,6, bei 30° inkubiert und die Reaktion wiederum dünnstschichtchromatographisch verfolgt. Während das Trisaccharid keine nachweisbare Spaltung erfährt, wird in den Vergleichsansätzen authent. und aus dem Trisaccharid isolierte α - β -Trehalose langsam geöffnet. Bei Erhöhung der Ferment- oder Substratkonzentration wird auch das Trisaccharid angegriffen. Dabei entsteht α - β -Trehalose, so daß die Spaltung wahrscheinlich durch die im Emulsin vorhandene α -Glucosidase¹⁵ bzw. Trehalaseaktivität¹⁶ verursacht ist. In Übereinstimmung damit wird auch eine sehr langsame Spaltung von Maltose und eine relativ rasche Öffnung der α - α -Trehalose gefunden.

Zusammenfassung

Die bei Züchtung auf D-Galaktose aus *Streptococcus faecalis* isolierte Glucotriose besteht nach fermentativer Untersuchung mit Glucoseoxydase ausschließlich aus D-Glucose. Alkalistabilität und fehlende Reduzierbarkeit durch Natriumborhydrid zeigen, daß sämtliche Glucoseeinheiten glykosidisch gebunden sind und bestätigt damit den unverzweigten Aufbau des Trisaccharids. In Übereinstimmung mit der aus den Produkten der partiellen Säurehydrolyse ermittelten Struktur einer 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α - β -trehalose wurde bei der Perjodatoxydation ein Verbrauch von 4 Mol Perjodat pro Mol Trisaccharid gefunden und nach anschließender Reduktion und Säurehydrolyse intakte Glucose nachgewiesen. Außerdem wurde die Struktur durch Permethylierung gesichert. Das gefundene $[\alpha]_D^{20}$ von +139 bis +145° stimmt mit zwei α -Bindungen und einer β -Bindung im Molekül überein. Nach Untersuchungen mit Maltase kann die β -Glucosyleinheit als mittelständig betrachtet werden, so daß der Glucotriose die Struktur O- α -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid zukommt.

¹⁵ B. Helferich, A. Appel u. R. Gootz, diese Z. **215**, 277 [1933].

¹⁶ B. Helferich u. A. Appel, diese Z. **205**, 233 [1932].

Summary

Enzymic studies with glucose oxidase show that a glucotriose, isolated from *Streptococcus faecalis* after growth on D-galactose, consists entirely of D-glucose. Alkali stability and the absence of reduction with sodium borohydride show that all the glucose units are joined by glycosidic linkages and confirm that the trisaccharide is unbranched. 4 mol. of periodate were consumed per mol. of trisaccharide and subsequent reduction and acid hydrolysis gave intact glucose; this is in agreement with the structure 3-O- α -D-glucopyranosyl- α,β -trehalose reported for the product of partial hydrolysis. The structure was confirmed by permethylation. The values for $[\alpha]_D^{20}$ of +139 to 145° agree with the presence of two α -linkages and one β -linkage in the molecule. From studies with maltase, the β -glucosyl unit is situated in the middle of the molecule, so that the structure of the glucotriose is O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, 8520 Erlangen, Wasserturmstraße 5.

Lebenslauf

Am 10. März 1938 wurde ich, Josef Krieglstein, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Lambert Krieglstein und seiner Ehefrau Berta, geb. Steidl, in Pechgrün (C.S.R.) geboren. Von 1946 bis 1948 besuchte ich die Volksschule und anschließend 6 Jahre die Private Realschule in Eschenbach (Oberpf.). 1957 erhielt ich das Reifezeugnis der Oberrealschule in Weiden (Oberpf.). Es folgte die zweijährige pharmazeutische Praktikantenzeit in der Stadtapotheke Eschenbach. Im Wintersemester 1959/60 begann ich das Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-Nürnberg und legte im März 1962 das Pharmazeutische Staatsexamen ab. Im September 1964 erhielt ich die Approbation als Apotheker. Bereits während meines Pharmaziestudiums im Wintersemester 1960/61 habe ich mich zusätzlich für Medizin eingeschrieben. Im Oktober 1962 erfolgte die Restprüfung in dem Fach Zoologie der naturwissenschaftlichen ärztlichen Vorprüfung und im Sommersemester 1963 habe ich die ärztliche Vorprüfung bestanden. Ab September 1963 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation bei Herrn Professor Dr. Dr. F. May.

